فصلنامه علمی – پژوهشی زیست شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۳ ، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹

اثر آنتی‌بیوتیک، ساکارز و زغال فعال بر کنترل آلودگی باکتریایی، اندام‌زایی و قهوه‌ای شدن در کشت مریستم انتهایی نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.)

معصومه اسکندری[۱]، پیام پورمحمدی*[۲]، خلیل عالمی سعید[۳]

تاریخ دریافت:۱۳۹۸/۳/۲۶
تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۱۰/۱۶

چکیده

در این تحقیق تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و کلرآمفنیکل بر آلودگی باکتریایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های نخل خرما مورد بررسی قرار گرفت همچنین اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و زغال فعال بر اندام‌زایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های این گیاه ارزیابی شد. در بخش اول این آزمایش مریستم انتهایی ساقه نخل خرما رقم استعمران، در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف آنتی بیوتیک‌های کلرآمفنیکل و سفوتاکسیم قرار گرفتند. در آزمایش دوم تأثیر سطوح مختلف ساکارز ($g\ L^{-1}$ ۵۰، ۴۰ و ۳۰) و سطوح زغال فعال ($g\ L^{-1}$ ۲ و ۰/۵) بر روی اندام زایی و قهوه ای شدن ریزنمونه های مریستم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در تیمار $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ کلرآمفنیکل کمترین میزان آلودگی وجود دارد و با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و کلرآمفنیکل در محیط کشت، قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها افزایش می‌یابد و بیشترین میزان قهوه ای شدن در محیط کشت حاوی $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ سفوتاکسیم و $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ کلرآمفنیکل رخ می‌دهد. ، نتایج همچنین نشان داد غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر ساکارز تفاوت معناداری از نظر القای اندامزایی کالوس‌ها با یکدیگر ندارند، ولی در غلظت ۵۰ گرم در لیتر ساکارز میزان اندام‌زایی به‌طور مشخصی کاهش یافت. در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده استفاده از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم در کشت بافت خرما توصیه نمی‌شود. غلظت $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل علاوه بر کاهش میزان آلودگی باکتریایی، منجر به افزایش معنی دار قهوه ای شدن ریز نمونه ها نیز نمی‌شود. همچنین غلظت‌های بالای ساکارز منجر به کاهش اندام‌زایی در کشت بافت خرما می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ***استعمران، کشت بافت، ریزازدیادی.***

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲- استادیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
*(نویسنده مسئول: Mohammadi@asnrukh.ac.ir)
۳- دانشیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

مقدمه

نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) گیاهی تک‌لپه از تیره Arecaceae ، چندساله، دیپلوئید (۲n=۳۶)، دوپایه، دگرگشن و همیشه سبز است (Al-Khayri & Naik, 2017). در حال حاضر ۲۱ درصد خرمای جهان از ایران تأمین می‌شود. در سال ۱۳۹۷ ایران با سطح زیر کشت بیش از ۲۵۰ هزار هکتار و با تولید بالغ بر ۱۲۵ هزار تن یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان خرما در جهان بود. که از این سطح ۸۴ درصد را درختان بارور و ۱۶ درصد را گیاهان غیر بارور تشکیل می‌دهند. خرما در بین محصولات باغی کشور از نظر سطح زیر کشت رتبه پنجم را دارد و از نظر تولید ۷/۲ درصد کل محصولات باغی را شامل می‌شود (Ahmadi et al, 2019).

تکثیر خرما از طریق جنسی و رویشی صورت می‌گیرد. دانه‌های نخل به آسانی رشد می‌کنند، اما نیمی از نهال‌ها ممکن است نر باشند و به دلیل هتروزیگوت بودن خرما، نتاج به شدت هتروژن می‌باشند و نسبت بالایی از آنها کیفیت انتخابی خوبی ندارند. علاوه بر این، نر یا ماده بودن نهال‌های بذری ۶ تا ۱۰ سال بعد از کاشت مشخص می‌شود (Othmani *et al*., 2009). تکثیر رویشی خرما با استفاده از پاجوش، باعث انتقال پاتوژن‌های بیماری‌زا و حشرات می‌شود، که باعث کم شدن باروری آن می‌شود. به علاوه، تولید پاجوش در یک دوره خاص از عمر درخت (۱۰ تا ۱۵ سال پس از کاشت) صورت می‌گیرد و در هر درخت تعداد محدودی پاجوش (۲۰ تا ۳۰ عدد) تولید می‌شوند. برای غلبه بر مشکل تکثیر، میزان کم زنده‌مانی پاجوش‌ها و نگهداری خزانه‌ی ژنی، ریزازدیادی تکنیک موفقیت آمیزی است؛ همچنین تنها تکنیکی است که گیاه عاری از بیماری، یکنواخت و با کیفیت جهت کشت در مقیاس وسیع و در یک دوره زمانی کوتاه را فراهم می‌کند (Khan & Bibi, 1971).

آلودگی باکتریایی یکی از مشکلات مهم در کشت بافت خرما است و باعث آلودگی و از بین رفتن درصد بالایی از ریزنمونه‌ها می‌گردد. حذف و کاهش آلودگی باکتریایی به‌وسیله ضد عفونی سطحی آسان نیست و تشخیص منبع آلودگی مشکل است (Al-Dosary *et al*., 2011; Al-Mussawi, 2010). استفاده از آنتی‌بیوتیک در محیط کشت یکی از راهکارهای پیشگیری از آلودگی باکتریایی در محیط کشت بافت خرما می‌باشد (Al-Mayahi *et al*., 2010). آنتی‌بیوتیک‌های نیستاتین، گریزئوفولوین و استرپتومایسین، آموکسی‌سیلین، جنتامایسین و کلرآمفنیکل در کشت بافت خرما استفاده شده اند .

(Al-Kaby, 2006 ; Al-Dosary *et al*., 2011).

منبع کربن به عنوان تامین‌کننده انرژی و عامل اسمزی برای رشد گیاهان در شرایط درون شیشه به کار می‌رود (Lipavska & Konradova, 2004). ساکارز، گلوکز، مالتوز، گالاکتوز و سوربیتول منابع کربوهیدرات مورداستفاده در کشت بافت می‌باشند. اغلب از ۲- ۵ درصد ساکارز در کشت بافت استفاده می‌شود و به طور متوسط برای کشت بافت نخل خرما از ۳ درصد ساکارز استفاده می‌شود (Al-Khalifah & Shanavaskhan, 2012).

قهوه‌ای شدن به دلیل تغییرات فیزیولوژیکی درون بافت‌های کشت شده رخ می‌دهد که منجر به قهوه‌ای شدن تدریجی و سرانجام مرگ بافت می‌شود. قهوه‌ای شدن بافت در اثر ترشح مواد پلی‌فنلی به محیط از محل برش و سپس اکسیدشدن آن‌ها به وسیله‌ی آنزیم‌های پلی‌فنول اکسیداز صورت می‌گیرد که در مرحله اول موادی به نام کوئینین‌ها تشکیل می‌شوند که برای بافت سمی می‌باشد. در نهایت این مواد به ملانین‌ها که رنگ قهوه‌ای تیره یا سیاه دارند، تبدیل می‌شوند (Al-Khayri & Naik., 2017). عوامل متعددی منجر به افزایش قهوه ای شدن بافت در شرایط درون شیشه ای می‌شود. از جمله این عوامل نور و سطح بالای تنظیم کننده‌های رشد سنتتیک مانند 2,4-D و BAP است (Baharan *et al*., 2015). این تحقیق با اهداف تعیین بهترین غلظت از آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و کلرآمفنیکل به منظور کنترل آلودگی باکتریایی و بررسی اثر آن‌ها بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و بررسی اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و زغال فعال بر اندام‌زایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های مریستم انتهایی خرما صورت گرفت.

مواد و روش ها

پاجوش‌های استعمران، به وزن ۵-۳ کیلوگرم، از پایه‌ی مادری از خزانه ارقام نخل خرما در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان در ابتدای اسفند ماه جدا شدند. پس از جداسازی بافت‌های چوبی، نمونه به مدت یک ساعت با آب شهری به همراه چند قطره شوینده شسته شد. بعد از برش رأس ساقه و جدا سازی منطقه مریستم رأسی (طول ۶-۵ سانتی‌متر)، ریزنمونه‌ها با آب مقطر شسته و در محلول آنتی‌اکسیدان اسید آسکوربیک و اسید سیتریک با نسبت $75{:}75\ mg\ L^{-1}$ (Khan & Bi Bi, 2012) به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند، سپس سترون‌سازی نمونه‌ها به صورت زیر انجام شد. ابتدا قطعات جداکشت به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و پس از یک بار شستشو با آب مقطر استریل، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد قرار گرفتند و سپس شستشوی نمونه‌ها با آب مقطر استریل شده ۳ بار و هر دفعه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. تمامی مراحل سترون‌سازی و کشت در زیر هود لامینار انجام شد. نمونه‌ها پس از مراحل استریل به مدت ۵ دقیقه در محلول $2\ g\ L^{-1}$ بنومیل اتوکلاو شده قرار گرفتند. pH محیط‌های کشت با استفاده از ۱ M NaOH و ۰/۱N HCl روی ۵/۸ تنظیم شد و در دمای $121^{o}\ C$ در فشار ۱۵ psi و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. کشت‌ها در شرایط تاریکی و در دمای $25\pm1^{\circ}C$ نگهداری شدند و واکشت و انتقال نمونه‌ها به محیط جدید با تیمارهای مشابه قبل با فاصله ۳ هفته‌ای انجام شد. ریزنمونه‌ها به مدت ۸ هفته در شرایط تاریکی نگهداری شدند و پس از آن به دوره‌ی روشنایی ۸/۱۶ ساعت (روشنایی/تاریکی) منتقل گردیدند. مشاهده و یادداشت برداری با فاصله ۷ روز یکبار تکرار شد.

تیمار آنتی‌بیوتیک

پس از انجام مراحل سترون‌سازی و قبل از کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت، هر نمونه در محلول آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل در سه سطح (۱۰۰ mg L^{-1} ، ۵۰، ۰) و سفوتاکسیم در سه سطح (۱۰۰ mg L^{-1} ، ۵۰، ۰)، به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت و پس از جدا کردن لایه‌های خارجی باقیمانده، مریستم‌های راسی جدا شدند و در محیط کشت پایه MS به همراه ، g L^{-1} ۴۰ ساکارز، ۸ g L^{-1} آگار-آگار، ۰/۵ g L^{-1} زغال فعال، آنتی‌اکسیدان‌های آسکوربیک اسید و سیتریک اسید با نسبت mg L^{-1} ۷۵:۷۵ ، تنظیم کننده‌های رشد شامل NAA ۱ mg L^{-1} و BAP ۳ mg L^{-1} و 2IP ۳ mg L^{-1} (Khan & Bi Bi, 2012) و اعمال تیمارهای آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل در ۳ سطح (۱۰۰ mg L^{-1}، ۵۰، ۰) و سفوتاکسیم در ۳ سطح (۱۰۰ mg L^{-1} ، ۵۰، ۰)، کشت گردیدند.

تیمار ساکارز و زغال فعال

پس از انجام مراحل سترون‌سازی و جدا کردن لایه‌های خارجی باقیمانده، مریستم راسی حاصل از ریزنمونه به چهار قسمت تقسیم شد و پس از آن ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS با آنتی‌اکسیدان‌های آسکوربیک اسید و سیتریک اسید با نسبت ۷۵:۷۵mg L^{-1}، IBA ۲ mg L^{-1}، 2IP ۵ mg L^{-1}، ۸ g L^{-1} آگار-آگار، ساکارز در سه سطح (۵۰ g L^{-1}، ۴۰ و ۳۰) و زغال فعال در دو سطح (۲ g L^{-1} و ۰/۵) کشت شدند.

آنالیز آماری

مشاهده و بررسی نمونه‌ها به منظور اطلاع از آلودگی باکتریایی، قهوه‌ای شدن و اندام‌زایی یک هفته بعد از کشت شروع شد و با فاصله ۷ روز یک‌بار تکرار شد و درصد آلودگی باکتریایی کشت‌ها در هفته هشتم محاسبه و ثبت شد. برای صفت آلودگی، تعداد ریزنمونه آلوده شده در هر تکرار مورد شمارش قرار گرفت. در مورد صفت قهوه‌ای شدن، یادداشت برداری به‌صورت کیفی انجام گرفت، به این صورت که به بالاترین میزان قهوه‌ای شدن عدد ۱۰ و به کمترین میزان قهوه‌ای شدن عدد صفر داده شد. برای صفت اندام‌زایی، تعداد نوساقه و تعداد ریشه‌چه تولید شده در هر ریزنمونه مورد شمارش قرار گرفت. بررسی‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی، در ۳ تکرار انجام شد که هر تکرار شامل ۲ ریزنمونه بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار آماری SPSS انجام شد و برای مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (LSR) استفاده شد.

نتایج

آزمایش آنتی‌بیوتیک

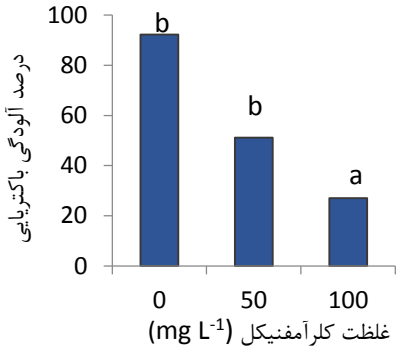
تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد؛ بین سطوح مختلف کلرآمفنیکل از نظر کنترل آلودگی باکتریایی تفاوت معنی‌داری وجود دارد اما بین سطوح مختلف سفوتاکسیم و اثر متقابل بین کلرآمفنیکل و سفوتاکسیم تفاوت معنی‌دار نیست. اثر غلظت‌های مختلف کلرآمفنیکل بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها، در سطح احتمال ۵ درصد و همچنین اثر غلظت‌های مختلف سفوتاکسیم و اثر متقابل این دو آنتی‌بیوتیک بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در سطح ۱ درصد معنادار است.

جدول ۱: تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و کلرآمفنیکل بر کنترل آلودگی باکتریایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در کشت بافت نخل خرما.

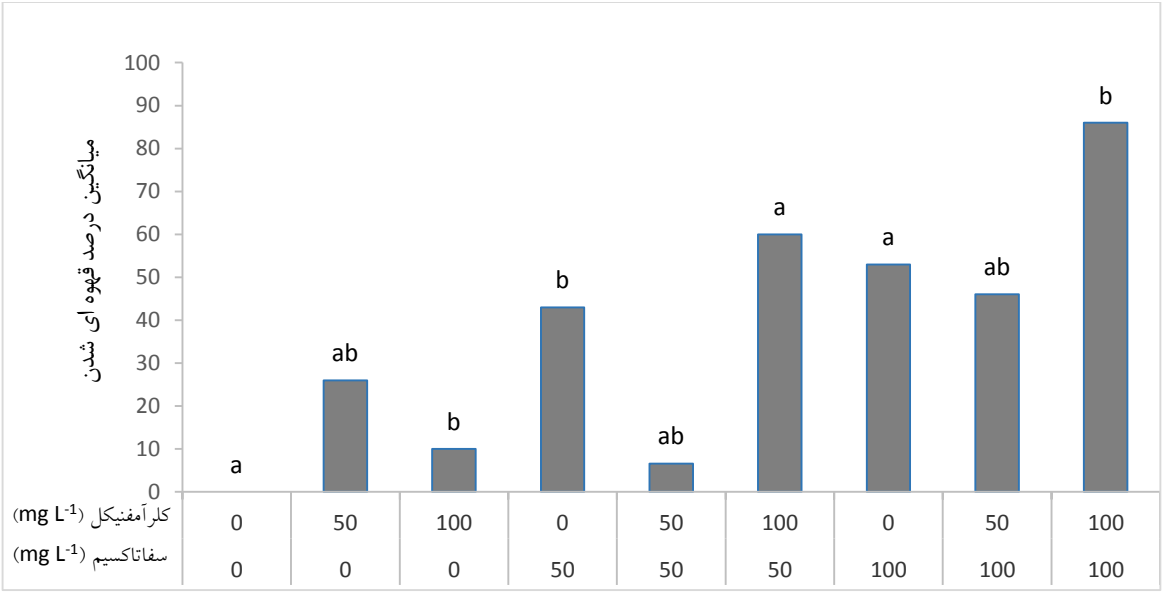
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		میزان آلودگی	قهوه‌ای شدن
کلرآمفنیکل	۲	۹۵/۸۱**	۱۶/۲۵*
سفوتاکسیم	۲	۱/۱۵ ns	۵۶/۲۵**
کلرآمفنیکل × سفوتاکسیم	۴	۳/۵۹ns	۱۲/۶۴ **
خطا	۱۸	۱۱/۷۴	۲/۷۷

**- معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، *- معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، ns غیر معنی‌دار

مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف کلرآمفنیکل بر روی آلودگی باکتریایی (نمودار ۱) نشان داد در تیمار $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ کلرآمفنیکل کمترین میزان آلودگی وجود دارد. مقایسه میانگین اثر متقابل تأثیر تیمارهای کلرآمفنیکل و سفوتاکسیم بر روی قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها (نمودار ۲) نیز نشان داد؛ با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و کلرآمفنیکل در محیط کشت، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها افزایش می‌یابد و بیشترین میزان قهوه‌ای شدن در محیط کشت حاوی $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ سفوتاکسیم و $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ کلرآمفنیکل رخ می‌دهد. همچنین در سطح صفر $mg\ L^{-1}$ سفوتاکسیم تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف آنتی بیوتیک کلرآمفنیکل در میزان قهوه‌ای شده مشاهده نشد. بر این اساس به نظر می‌رسد؛ اضافه کردن آنتی بیوتیک سفوتاکسیم به محیط کشت همراه با آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل یا بدون آن، منجر به افزایش قهوه‌ای شدن بافت می‌شود. از طرفی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم تا سطح $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ تأثیر معنی‌داری بر کنترل آلودگی نیز نداشت. با توجه به این نتایج، استفاده از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم در کشت بافت خرما توصیه نمی‌شود. غلظت $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ از آنتی بیوتیک کلرآمفنیکل علاوه بر کالوس‌زایی و کاهش میزان آلودگی باکتریایی به میزان قابل قبول، منجر به افزایش معنی‌دار قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها نیز نمی شود (شکل ۱).



نمودار ۱: مقایسه تأثیر سه سطح آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل بر روی میزان آلودگی باکتریایی ریزنمونه مریستم نخل خرما با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪



نمودار ۲: مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل و سفوتاکسیم بر روی درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه مریستم نخل خرما. میانگین های دارای حروف مشابه با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند .

این نتایج با نتایج Al-Dosary و همکاران (۲۰۱۰) که نشان دادند؛ استفاده از آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین، جنتامایسین و کلرآمفنیکل کارایی زیادی برای پیشگیری از آلودگی باکتریایی در کالوس‌زایی خرما دارد مطابقت دارد آنها همچنین نشان دادند بهترین نتیجه در تیمار $mg\ L^{-1}$ ۵۰ کلرآمفنیکل به دست آمد که از رشد باکتری‌های باسیلوس، استافیلوکوکوس و پروتئوس پیشگیری کرد. در پژوهش دیگری نشان داده شد غوطه‌ور کردن بافت‌های آلوده در محلول آنتی‌بیوتیک قبل از استریل آن‌ها و استفاده از بافت‌های جوان خرما در کشت بافت می‌تواند آلودگی باکتریایی را کاهش دهد (Benjama *et al.*, 2001).

شکل ۱: کالوس‌زایی مریستم انتهایی در خرما در محیط کشت حاوی $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ کلرآمفنیکل

آزمایش ساکارز و زغال فعال

آزمایش نشان داد اثر ساکارز به تنهایی بر اندام‌زایی ریزنمونه‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار است ولی اثر آن بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها معنی‌دار نیست. علاوه بر این اثر زغال فعال و همچنین اثرات متقابل دوجانبه ساکارز در زغال فعال بر اندام‌زایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها معنی‌دار نیست (جدول ۲).

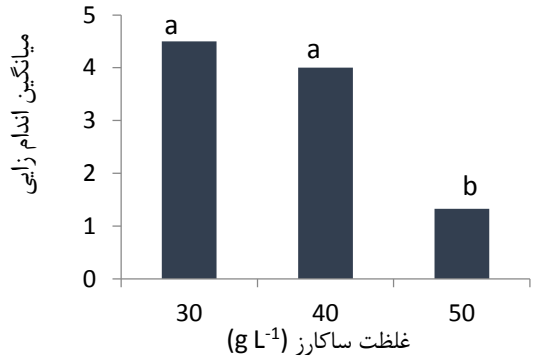
مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ساکارز بر اندام‌زایی ریزنمونه‌ها نشان داد؛ غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر ساکارز تفاوت معناداری با یک‌دیگر ندارند اما غلظت ۵۰ گرم در لیتر ساکارز نسبت به دو غلظت دیگر تفاوت معناداری مشاهده شد و میزان اندام‌زایی به‌طور مشخصی کاهش یافت (نمودار ۳ و شکل ۲).

جدول ۲: تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز و زغال فعال بر اندام زایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در کشت بافت نخل خرما.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		اندام‌زایی	قهوه‌ای شدن
ساکارز	۲	۱۹/۰۵۰**	۷/۱۰۸ ns
زغال فعال	۱	۲/۳۱۷ ns	۰/۰۹۲ ns
ساکارز×زغال فعال	۲	۷/۰۹۰ ns	۲/۲۶۱ ns
خطا	۱۱	۲/۸۳۹	۳/۵۸۸

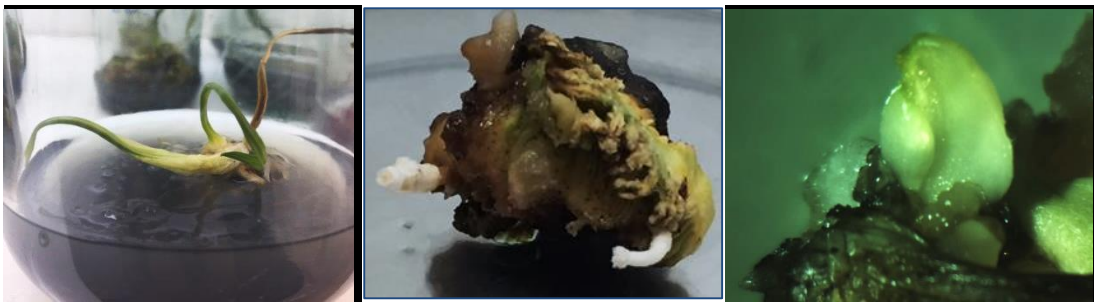
ns غیر معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

Al-Khateeb (۲۰۰۸) نشان داده بود؛ ۳۰ تا ۵۰ گرم قند به‌عنوان منبع کربن در محیط کشت برای رشد کمی و کیفی نوساقه‌ها کافی است که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. گرچه تفاوت معنی‌داری بین مصرف ۰/۵ گرم در لیتر و ۲ گرم در لیتر زغال فعال دیده نشد؛ اما می‌توان گفت این نتیجه تا حدی با نتایج Othmani و همکاران (۲۰۰۹) که مصرف ۰/۳ گرم زغال فعال را کافی دانسته بودند، مطابقت دارد ولی ظاهراً با نتایج Tisserat (۱۹۸۴) که مصرف ۳ گرم زغال فعال را برای کاهش قهوه‌ای شدن و استقرار ریزنمونه‌ها لازم دانسته بود، مطابقت ندارد. ممکن است دلیل این اختلاف، تفاوت رقم مورد آزمایش باشد.



نمودار ۳: مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف ساکارز بر اندام زایی ریزنمونه مریستم نخل خرما با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪

در گزارش دیگری تأثیر منابع مختلف کربن (ساکارز، گلوکز، فروکتوز و مالتوز) و غلظت‌های مختلف آن‌ها در تکثیر خرما رقم خنیزی به روش اندام‌زایی مستقیم در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد افزایش غلظت قند سبب افزایش در وزن خشک گیاهان تولید شده گردید و اثر گلوکز، فروکتوز و مالتوز با اثر ساکارز به عنوان منبع کربن در کشت بافت خرما برابر بود (Al-Kaby, 2004).



شکل ۲: اندام‌زایی ریز نمونه مریستم انتهایی خرما در غلظت ۳۰ g L^{-1} ساکارز و ۵۰۰ mg L^{-1} زغال فعال

مشخص شده که سیتریک اسید، آسکوربیک اسید و زغال فعال در تعامل مثبت با هم بوده و اثر مثبت بر زنده ماندن ریزنمونه‌های خرما دارند. آسکوربیک اسید به عنوان ممانعت کننده از اکسیداسیون فنول‌ها عمل کرده و کوئینین تشکیل شده را خارج می‌کند. احتمالا سیتریک اسید به عنوان عامل کلاته کننده عمل کرده و تخریب آسکوربیک اسید را با تاخیر می‌اندازد (Khan & Bibi, 1971). اثرات مثبت زغال فعال در از بین بردن ترکیبات مهارکننده است، همچنین باعث کاهش شدید اکسیداسیون فنول‌ها می‌شود. استفاده از ۰/۳ g L^{-1} زغال فعال باعث افزایش قدرت زیست ریزنمونه‌ها در برگ نابالغ خرما شده است (Othmani *et al*., 2009) و منجر به افزایش اثر اکسین در محیط کشت، تغییر خواص محیط کشت در جهت کاهش جذب تنظیم‌کننده‌های رشد و دیگر ترکیبات می‌شود (Khan & Kauser, 2011). در مطالعه دیگری کاربرد ۳ g L^{-1} زغال فعال در محیط کشت، صرفاً منجر به کاهش اکسیداسیون فنول‌ها شد (Tisserat, 1984).

کشت بخش‌های گیاهی در فصل زمستان و بهار و افزودن زغال فعال به محیط کشت می‌تواند این پدیده را کاهش دهد (Al-Khateeb, 2008). همچنین اسکوربیک اسید پیش از تیمارهای ضدعفونی سطحی و کشت روی محیط MS دارای ۳ گرم بر لیتر زغال فعال، بهترین روش برای جلوگیری از این پدیده گزارش شده است (Taha *et al*., 2007). Othmani و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی کشت بافت یک رقم خرما، برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن، از ریز نمونه‌های جوان استفاده کردند. آن‌ها گزارش دادند که بیشترین ترکیبات قهوه‌ای کشنده، در مرحله‌ی ابتدای کشت تولید می‌شود که به دلیل اکسید شدن ترکیبات فنولیک و تجمع کوئینین‌ها که برای بافت سمی محسوب می شود.

فعالیت پلی‌فنل‌اکسیدازها (مؤثر در اکسیداسیون ترکیبات فنلی و تانن‌ها) در شرایط نور بیشتر از تاریکی است. با افزودن زغال فعال (غلظت بین ۰/۲ تا ۳ درصد وزن به حجم) و آنتی‌اکسیدانت‌ها به محیط کشت از تولید این ترکیبات ممانعت می‌شود. معمول‌ترین مواد آنتی اکسیدانت سیتریک اسید و آسکوربیک اسید هستند که معمولا با غلظت ۱۵۰-۵۰ $mg\ L^{-1}$ استفاده می‌شوند. این ترکیبات پتانسیل ردوکس (اکسایش-احیا) ریزنمونه را کاهش داده و از اکسیداسیون فنل‌ها جلوگیری می‌کنند (Al-Khayri & Naik, 2017).

نتیجه‌گیری

در مجموع با توجه نتایج بدست آمده استفاده از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم در کشت بافت خرما توصیه نمی‌شود و $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰ از آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل علاوه بر کاهش میزان آلودگی باکتریایی به میزان قابل قبول، منجر به افزایش معنی دار قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها نیز نمی‌شود. همچنین غلظت‌های بالای ساکارز منجر به کاهش اندام‌زایی در خرما می‌شود.

منابع

Ahmadi, k., Ebadzade, H.R., Hatami, F., Hoseinpour, R., Abdeshah, H. (2019) Iran agriculture statistics, pages 51-52. Iran Ministry of Agriculture-Jahad (Farsi Edition).

Al-Dosary, N.H., Al-Mussawi, M.A. and Al- Taha, H.A. (2011). Isolation and identification of bacterial types that cause contamination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) callus and studying the inhibition activities of some plant extracts and antibiotics. Basra Journal of Date Palm Research, 10(1):68-81.

Al-Kaby, A.M.S. (2004). The effect of some antibiotics and fungicides on the growth of embryogenic callus of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Basra Journal of Date Palm Research, 3(1/2): 97-110.

Al-Khalifah, N.S. and Shanavaskhan, A.E. (2012). Micropropagation of Date Palms. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB) and Association of Agricultural Research Institutions in the Near East and North Africa (AARINENA). P: 54.

Al-Khateeb, A. (2008). Regulation of in vitro bud formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi by different carbon sources. Bioresource Technology 99: 6550-6555.

Al-Khayri, J.M. and Naik, P.M. (2017). Date palm micropropagation: advances and applications. Ciênc Agrotechnology, 41(4):347-358.

Al-Mayahi, A.M., Ahmed, A.N. and Al-Khalifa, A.A. (2010). Isolation and identification of associated fungi with the micropropagation of five different date palm cultivars and the effect of Benlate fungicides in their control. Basra Journal of Date Palm Research, 9(2):79-97.

Al-Mussawi, M.A. (2010). The source of bacterial contamination of date palm *Phoenix dactylifera* L. tissue cultures. Basra Journal of Date Palm Research, 9(2):132-146.

Baharan, E., Mohammadi, P.P., Shahbaziand, E. and Hosseini, S.Z. (2015). Effects of some plant growth regulators and light on callus induction and explants browning in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* leaves culture. Iranian Journal of Plant Physiology, 5 (4): 1473-1481.

Benjama, A., Cherkaoui, B. and Al-Maii, S. (2001). Origin and detection of Bacillus contaminating date palm vitro-culture and importance of manipulations conditions. Al Awamia, 104: 73-74.

Khan, S. and Bi Bi, T. 2012. Direct shoot regeneration system for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) CV. Dhakki as a Means of Micropropagation. Biotechnology Division, Pakistan Journal of Botany 44: 1965-1971.

Khan, S. B., Saeed and Kauser, N. (2011). Establishment of genetic fidelity of *in vitro* raised banana plantlets. Pakistan Journal of Botany, 43(1): 233-242.

Khan, S.B. and Kauser, N. (2011). Establishment of genetic fidelity of *in vitro* raised banana plantlets. Pakistan Journal of Botany, 43(1): 233-242.

Lipavska, H. and Konradova, H. (2004). Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant. 40: 23-30.

Othmani, A., Bayoudh, C., Drira, N. and Trifi, M. (2009). In vitro cloning of date palm *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Bey by using embryogenic suspension and temporary immersion bioreactor (TIB). Journal of Biotechnology & Biotechnological Equipment, 23: 1181-1185.

Taha, H. S., Hasan, M. M., and El-Bahr, M. K. (2007). Micropropagation of same egyptian date palm dry cultivars: 1-Maturation of somatic embryos. Arab Journal of Biotechnology, 10: 333-340.

Tisserat, B. (1984). Propagation of date palms by shoot tip cultures. Horticulture Science, 19:230–231.

The effect of the antibiotic, sucrose and activated charcoal on bacterial contamination, browning and organogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) meristem culture

M. Eskandari[1], P. Pour Mohammadi[2*], Kh. Alami Saeid[3]

Received: 2019.6.16
Accepted: 2020.1.6

Abstract

In the current study, the effect of antibiotic on bacterial contamination and browning in *in vitro* condition and effect of different concentration of sucrose and activated charcoal in organogenesis and browning date palm explants were investigated. In first experiment, apex meristems of date palm (*Phoenix dactylifera*) cv. Estamaran were cultured in media containing two types of antibiotics (cefotaxime and chloramphenicol) at 3 different concentrations (0, 50, or 100 mg L^{-1}). In the second experiment effect of different concentration of sucrose (30, 40 and 50 g $L^{-1)}$ and 2 concentration of activated charcoal (0.5 and 2 g L^{-1}) on organogenesis and explant browning were studied. Result showed that minimum bacterial contamination accrued in 100 mg L^{-1} chloramphenicol in the medium. The maximum browning occurred in medium contain 100 mg L^{-1} cefotaxime and 100 mg L^{-1} chloramphenicol. In second experiment shoot regeneration was enhanced when sucrose concentration was used at 30 or 40 g l^{-1}, but 50 g L^{-1} of sucrose reduce that. Also the use of 0.5 g L^{-1} and 2 g L^{-1} activated charcoal was not significantly different to reduce the browning of explants. This result developed an initial protocol for micropropagation of date palm. The type and concentration of antibiotic and sucrose concentration were found to have significant effect on organogenesis and browning of explants. Treatment with higher levels of antibiotic (especially cefotaxime) increased browning. This successful protocol would facilitate the vegetative propagation, conservation, and genetic engineering of this species.

Keywords: Estamaran, Tissue culture, Micropropagation.

1-M.Sc. of plant breeding, Plant Production and Genetics Department, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
2-Assistant Prof. of Plant Production and Genetics Department, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
*(Corresponding Author : Mohammadi@asnrukh.ac.ir)
3-Associate Prof. of Plant Production and Genetics Department, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran